



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 특허출원 2003년 제 0075272 호
Application Number 10-2003-0075272

출원년월일 : 2003년 10월 27일
Date of Application OCT 27, 2003

출원인 : 주식회사 에프앤피
Applicant(s) FNP, Inc.

2004년 11월 15일

특허청
COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【제유명】 특허 출원서
【제리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2003.10.27
【발명의 명칭】 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체 및 상기 식물체
를 검출하는 방법
【발명의 영문명칭】 Plant resistant to cucumber mosaic virus and method
for detecting the plant

【출원인】 김신재
【성명】
【출원인코드】 4-2002-021744-6

【代理人】 김석현
【성명】
【대리인코드】 9-1998-000634-1
【포괄위임등록번호】 2003-073325-5

【발명자】
【성명】 김신재
【출원인코드】 4-2002-021744-6

【국적】
【성명의 국문표기】 황주광
【성명의 영문표기】 HWANG, Ju Kwang
【주민등록번호】 440728-1001612
【우편번호】 135-280

【주소】 서울시 강남구 대치동 은마아파트 28동 304호
【국적】 KR

【성명의 국문표기】 김군보
【성명의 영문표기】 KIM, Goon-Bo
【주민등록번호】 710810-1951112
【우편번호】 441-340

【주소】 경기도 수원시 권선구 구운동 949-3 동원빌라 102호
【국적】 KR

【발행자】

【성명의 국문표기】 김수
【성명의 영문표기】 KIM,Su
【주민등록번호】 720620-1794317
【우편번호】 361-201
【주소】 충북 청주시 흥덕구 분평동 분평주공2단지 213동 905호
【국적】 KR

【착신업자 및 아마노산 서열목록】

【서열개수】 28
【서열목록의 전자파일】 첨부
【내지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.
대리인
김석현 (인)

【수료】

【기본출원료】	20	면	29,000 원
【기선출원료】	19	면	19,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	0	항	0 원
【합계】	48,000 원		
【김면시유】	개인 (70%김면)		
【김면후 수수료】	14,400 원		
【부서류】	1. 요약서·영세서(도면)_1종		

【요약서】

【약】

본 발명은 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체 및 상기 식물체를 검출하는 법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 서열번호 22로 기재되는 염기서열 중에서 택되는 일련의 염기서열을 포함하는 프라이머를 이용하여 상기 식물체를 검출하는 법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 프라이머 및 상기 프라이머에 의해 증폭된 DNA 단편을 이용하여 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체를 검출하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 방법은 오이 모자이크 바이러스를 식물에 직접 접종하지 않고서도 신속하고 정확하게 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체를 검출할 수 있는 장점이 있다.

【표도】

도 7

【인어】

④ 모자이크 바이러스, 저항성 선별 마커, RAPD

【명세서】

【명의 명칭】

오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체 및 상기 식물체를 검출하는 방법(Plant
resistant to cucumber mosaic virus and method for detecting the plant)

【면의 간단한 설명】

도 1은 오페론 프라이머(OPC-04 내지 OPC-08 및 OPC-10)를 이용하고 오이 모자이크 바이러스 저항성 DNA 풀(pool) (R)과 이병성 DNA 풀(S)을 주형으로 사용하여 PCR 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

도 2a 및 도 2b는 저항성 식물체 (R_0) 및 그의 F1 (R_1) , 이병성 식물체 (S_0) 및의 F2 (S_1) . 저항성 F2 및 이병성 F2에 대하여 RAPD-PCR을 수행한 결과를 나타내는 진이다.

도 3은 OPC-07 프라이머에 의해 증폭된 DNA 결편을 텁침으로 하여 서던블릿을 행한 결과이다.

R: 저항성 식물체

S: 이병성 식물체

도 4는 서열번호 23 및 서열번호 24의 프라이머를 이용하여 CAPS를 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

도 5는 서열번호 23 및 서열번호 25의 프라이머 조합을 이용하여 CAPS를 수행 결과를 나타내는 사진이다.

A: *EcoR I* 으로 절단한 경우

B: *Xba I* 으로 절단한 경우

도 6은 서열번호 23 및 서열번호 26의 프라이머 조합을 이용하여 CAPS를 수행

결과를 나타낸는 사진이다.

도 7은 서열번호 27 및 서열번호 28을 이용하여 CAPS를 수행한 결과를 나타내

사진이다.

발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체 및 이를 검출하는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 오이 모자이크 바이러스 저항성 인자를 함유하는 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체 및 오이 모자이크 바이러스 저항성 유전자와의 관정도가 높은 염기서열을 이용하여 상기 식물체를 검출하는 방법에 관한 것이다.

【오이 모자이크 바이러스(Cucumber Mosaic Virus: 이하 'CMV'라 함)는 식물 바이

스 중에서도 기주 범위가 가장 넓은 식물병원 바이러스로서 전세계적으로 쌍

업 및 단자업의 약 900여 종의 식물에 큰 경제적 피해를 주고 있다. 식물이 CMV에 감염되면 잎, 줄기 및 과실에 모자이크 증상을 나타난다. 특히 병에 걸린 잎은 작지고 조금 포고해지며, 잎맥을 따라 괴리가 생기게 된다. 과실에는 녹색능 đám의 모이크가 나타나고 율동불통해져 상품가치가 떨어진다.

한편, 병 저항성 품종을 육종하기 위해서는 병 저항성 인자들을 갖는 다른 품종으로부터 계속적인 역교배를 통하여 그 인자들을 도입하여야 하며, 도입 단계마다 저항성 험을 거쳐 선발하여야 하는데, 이러한 선발 단계에서 상기 병 저항성 인자와 밀접하게 연관되어 있는 문자 표지를 이용한다면 매우 편리할 것이다. 따라서, 문자 표지를 이용한 CMV의 진단 방법 및 형질 전환을 통한 CMV 저항성 품종 개발에 대한 다양한 기술들이 개발되어 왔다. 예를 들면, 대한민국 특허출원 제2000-0025699호에서 쿠쿠모바이러스 (*Cucumovirus*) 그룹에 속하는 CMV, 땅콩 위축 바이러스 및 토마토 스파미 바이러스들 한 가지 세트의 유전자 증폭용 프라이머로 진단할 수 있는 쿠쿠 바이러스 진단용 프라이머의 염기서열 및 이를 이용한 유전자 진단 및 등정 방법을 제시하고 있다. 대한민국 특허등록 제0293567호에서는 국내에서 분리한 CMV 외피 백질 유전자를 토마토에 형질 전환시키는, CMV에 대한 저항성 계통의 개발 방법을 시하고 있다. 또한, 대한민국 특허출원 제1893-0029605호에는 작물에 병을 일으키 CMV에 대하여 저항성을 갖는 형질전환 작물을 제조하기 위해 CMV 외피 단백질 유자의 RNA를 공격하는 망치머리형 라이보자임이 기재되어 있다.

상기한 바와 같이, CMV 저항성의 진단 및 CMV 저항성을 갖는 식물의 개발에 관 종래의 기술들은 모두 CMV의 외피 단백질 유전자를 그 대상으로 하고 있으며, 식 세 고유의 CMV의 저항성 인자에 대한 기술 개발은 보고된 바 없다.

따라서, CMV 저항성 인자를 갖는 식물체 계통으로부터 상기 바이러스 저항성 판문자 표지의 개발 및 개발된 문자 표지를 이용하여 식물체에서의 CMV 감염 여부를 단단히 방법의 개발이 절실히 요구되어 왔다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, CMV 저항성 인자를 함유하는 CMV 저항성 식물체를 제공한다.

또한 본 발명은 CMV 저항성 유전자와의 연관정도가 매우 높은 염기서열을 이용하여 CMV 저항성 식물체를 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 구성 및 작용】

상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 22로 기재하는 염기서열을 함유하는 CMV 저항성 식물체를 제공한다.

본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 22로 기재되는 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 22로 기재되는 염기서열 중에서 선택되는 일련의 염기서열을 포함하는 CMV 저항성 식물체 검출용 라이머 및 이를 이용하여 CMV 저항성 식물체를 검출하는 방법을 제공한다.

또한 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 프라이머를 이용하여 CMV 저항성 식물체 검출하는 방법을 제공한다.

나아가 본 발명은 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 포함하는 표지인자들 이용

여 CMV 저항성 식물체를 검출하는 방법을 제공한다.

본 발명에서 '오이 모자이크 바이러스(CMV) 저항성 식물체'라 함은, 서열번호로 기재되는 염기서열을 함유하며 CMV에 대하여 저항성의 형질을 나타내는 식물체 말한다. 상기 식물체에는, 이에 제한되지는 않으나, 오이, 수박, 고추, 메론, 배, 담배, 페튜니아, 목화 및 장미가 포함된다. 또한 상기 식물체는 식물의 기관, 조직, 세포, 종자 및 캠러스를 포함한다.

또한 본 발명에서 'CMV 저항성 유전자에 근접한 부위의 염기서열'이란 서열번호로 기재되는 염기서열을 갖는 플리뉴클레오티드로서, CMV 저항성 형질과 밀접하게 관련 서열을 말하는 것이다. 상기 서열번호 22의 염기서열은 CMV 저항성 유전자와 당히 근접되어 있으므로, 상기 염기서열들이 나타내는 어떠한 다형성을 사용하더라도 그 유전자의 존재여부를 파악하는 데 사용할 수 있다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 CMV 저항성 인자들 갖는 CMV 저항성 식물체를 제공한다. 상기 CMV 저항성 인자는 서열번호 22로 기재되는 염기서열이다. 서열번호 22로 기재되는 염기서열을 함유하는 CMV 저항성 식물체의 CMV 저항성의 유전 유무를 조사한 결과, 상기 저항성은 우성의 단일 유전자에 의해 결정되는 것임이 규명되었다. 본 발명의 저항성 식물체는 당업계에 공지된 일반적인 조직 배양 방법으로 무성번식될 수

다. 예컨대, 기관 발생에 의한 미세증식법(형성된 기관이 없는 일, 일자루, 증기
디, 자엽, 자엽속 등의 조직을 배양하여 새로운 눈을 상기 조직의 표면에 유도해
는 방법) 또는 캠리스 유도를 통한 재분화 방법 등으로 무성번식 될 수 있다. 또
본 발명은 상기 CMV 저항성 식물체로부터 수득되고, 서열번호 22의 염기서열을 함
하는 종자들 제공한다.

본 발명은 서열번호 22의 염기서열 중에서 선택되는 일련의 염기서열을 포함하
오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체 검출용 프라이머를 제공한다. 상기 프라
머는 서열번호 22의 염기서열 중에서 선택되는 최소 8개, 바람직하게는 최소 12개
상의 일련의 염기를 포함한다. 바람직한 프라이머는 서열번호 23 내지 28 중에서
선택되는 염기서열을 가지며, 보다 바람직하게는 서열번호 23 및 서열번호 24, 서열
호 23 및 서열번호 25, 서열번호 23 및 서열번호 26, 그리고 서열번호 27 및 서열
호 28의 프라이머 조합 중에서 선택될 수 있다. 본 발명은 상기 프라이머를 이용
여 CMV 저항성 식물체를 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 프라이머를
1용한 PCR을 통해, 바람직하게는 CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence)
석, RAPD(random amplified polymorphic DNA) 분석, AFLP(amplified
segment-length polymorphism) 등을 통해 수행될 수 있다. 보다 바람직하게는 하기
단계를 포함하는 방법을 통해 수행될 수 있다:

(a) CMV 저항성 및 이병성 식물체로부터 얻은 DNA를 주형으로 하고 서열번호 22
염기서열 중에서 선택되는 일련의 염기를 포함하는 프라이머를 이용하여 PCR을 수
하는 단계:

(b) PCR 산물을 제한효소로 결단하는 단계:

(c) 점단된 DNA 단편들을 아가로스 젠에 로딩하여 전기영동하는 단계: 및

(d) 전기영동이 완료된 젠의 DNA 빤드 양상을 비교하는 단계.

상기 방법에 사용될 수 있는 제한효소는 서열번호 22로 기재되는 염기서열 내에
존재하는 제한효소라면 제한없이 사용될 수 있으며, 비람직하게는 *Xba*I 또는 *Eco*R
을 사용할 수 있다. 상기 방법으로 CMV 저항성 식물체를 검출할 수 있으며. 또한
증된 식물체의 유전자형 (genotype)을 감별할 수도 있다(도 4 내지 도 7 참조).

또한 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 프라이머를 이용하여
CMV 저항성 식물체를 검출하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 프라이머를 이용
하는 PCR을 통해 수행될 수 있다. 구체적으로는 하기의 단계를 포함한다:

(a) CMV 저항성 및 이병성 식물체로부터 얻은 DNA를 주형으로 하고 서열번호 1
기재되는 염기서열을 갖는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하는 단계:

(b) PCR 산물을 아가로스 젠에 로딩하여 전기영동하는 단계: 및

(c) 전기영동이 완료된 젠의 DNA 빤드 양상을 비교하는 단계.

본 발명에서는 서열번호 1로 기재되는 프라이머를 이용한 PCR을 통하여 CMV 저
항성 식물체를 검출할 수 있음을 확인하였다(도 1 참조).

또한 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 프라이머에 의해 증폭된 DNA 단편을 제
한다. 상기 단편은 CMV 저항성 식물체를 검출하기 위한 표지 인자로 사용될 수 있
다. 상기 단편의 염기서열은 서열번호 2로 기재하였다. 따라서, 본 발명은 서열번

2로 기재되는 염기서열을 갖는 표지인자를 이용하여 CMV 저항성 식물체를 검출하

방법을 제공한다. 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다:

(a) CMV 저항성 및 이병성 식물체로부터 얻은 세포 DNA를 적당한 제한효소로 절

하는 단계:

(b) 절단된 DNA 단편을 아가로스 젤 상에서 전기영동하는 단계:

(c) 젤 상의 DNA를 나일론 막으로 전이시키는 단계:

(d) 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 표지인자를 탐침으로 하여 서던 블

을 수행하는 단계: 및

(e) X-ray 필름 상에 노출시켜 밴드 양상을 비교하는 단계.

상기 방법에 사용될 수 있는 제한효소는 당업계에 공지된 제한효소라면 제한없

사용될 수 있으며, 바람직하게는 EcoR I, EcoR V, HindIII 및 Xba I로 이루어진 군

서 선택되는 효소들 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예는

본 발명은 설명하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리 범위를 본 실시예로 한정하고자

는 것은 아니다.

<실시예 1>

CMV 저항성 고추 식물체의 순화 및 마커 개발을 위한 교배 검단 작성과 CMV

합성의 유전양식 구현

다양한 고추 식물체에 CMV를 접종하여 저항성 식물체를 스크리닝하였다. 그 결과 엘지엔조 계통 중 한 식물체가 CMV 저항성인 것으로 확인되었다. 선발된 식물체 'FP11'이라 명명하였다. 선발된 FP11의 CMV 저항성의 유전 유무를 테스트하기 위하여 자가수분 집단 및 교배집단을 작성하였다. 상기 교배집단은 FP11을 이병성 계인 FP14와 교배시켜 작성하였다. 교배된 F1 총자를 파종하여 자가수분시켜 F2 집단을 만들고, 다시 각각의 F2 식물체를 자가수분시켜 F3 집단을 만들었다. F2와 F3 집단을 대상으로 CMV 저항성을 테스트한 결과, CMV 저항성은 F2 집단에서 3:1의 비율로 유전되며, F3 세대에서 호모 (homo)와 헤테로 (hetero)의 비율이 1:2로 분리되었다.로부터 CMV 저항성은 우성의 단일 유전자에 의하여 결정되는 것임을 확인할 수 있다.

<실시예 2>

식물체로부터 DNA 추출

DNA 추출은 프린스 등의 방법 (Prince, J. P., et al., *HortScience* 32:937-939, 1997)을 변형하여 수행하였다. -80°C에서 보관한 고추 잎을 액체 질소를 이용하여 쇄한 후, 25mL의 DNA 추출 버퍼 (7M 우레아, 0.35M 염화나트륨, 0.05M Tris-HCl 8.0, 0.02M EDTA, 0.25% sarkosyl, 5% 페놀, 0.2% sodium bisulfate)와 잘 혼합하였고, 이후, 0.75mL의 20% SDS를 넣고 65°C에서 10분마다 흔들어 주면서 30분간 배양하였다.

풀로로포듬: 이소아밀알코올(24:1) 용액을 50mL 뮤브의 꿀부분까지 채워 15분간 섞어 주었다. 혼합액을 5,000rpm으로 15분간 원심분리한 후, 수득된 상층액을 무선(cheesecloth)을 이용하여 새로운 50mL 뮤브에 옮겼다. 이후, 상기 뮤브에 등인 부피의 이소프로판을 첨가하고 혼합한 후, 1시간 동안 DNA를 침전시켰다. U자 의 파스퇴르 피펫을 이용하여 침전된 DNA를 채취하여 1.5mL 마이크로 뮤브에 넣고, % 에단올을 첨가하여 DNA를 재침전시켰다. 실온에서 30-40분 동안 건조시켰다.

기 건조된 DNA 펜셋에 600-700 μ L의 TE 버퍼(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)를 가하여 65에서 1시간 동안 배양하였다. 원심분리 과정을 3회 반복하였다. 이후, DNA를 5mL 뮤브에 옮기고 RNase(100 μ g/mL)를 첨가하여 RNA를 제거하였다. 정제된 DNA의 총 농도는 형광계를 이용하여 측정하였다.

<실시예 3>

CMV 저항성 유전자 연결 RAPD 프라이머의 선별

CMV 저항성 유전자에 연관된 DNA 마커를 선별하기 위하여 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNAs) (Williams, J. G. K. et al., *Nucl. Acids Res.* 18, 31-6535, 1990)와 BSA(Bulked Segregant Analysis) 방법(Michelmore, R.W., et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 88:9828-9832, 1991)을 이용하였다. 상기 실시예 1의 집단으로부터의 CMV 저항성 검정 결과를 바탕으로 저항성 F2 식물체 10개체의 DNA(pool)과 감수성 F2 식물체 10개체의 DNA 풀을 만들고, 끌로 만들어진 DNA 농도가 ng/ μ L가 되도록 조절한 후, 이를 주형으로 사용하여 PCR을 수행하였다. 이 때

PD 프라이머를 위해 Operon RAPD 10-mer 키트 (Operon, Alameda, CA, USA) 중에서
리즈 A부터 시리즈 T까지의 약 400개 프라이머를 대상으로 PCR 반응이 양호하게 일
나는 프라이머를 147개 선별한 후, 선별된 프라이머를 사용하여 저항성 DNA 풀과
수성 DNA 풀간에 특이적으로 다르게 증폭되는 팬드를 탐색하였다.

PCR 반응 조성물은 1 X PCR 버퍼, 60ng 주형 DNA, dNTP 0.3mM, 프라이머 0.6pM,
5mM MgCl₂, 0.6Unit Taq DNA 중합효소 (Takara, Japan)를 혼합하여 총 부피를 25μL
조정하였다. PCR 증폭은 94°C 4분간 주형 DNA를 변성시킨 후, 94°C 1분, 36°C 1
30초 및 72°C 1분 50초를 한 사이클로 하여 총 45회 반복한 후, 72°C에서 5분간 반
시켜 종결하였다. 그 결과, 도 1에서 보는 바와 같이, OPC-07 프라이머 (서열번호
를 이용한 PCR에서 1개의 저항성 pool에만 특이적으로 나타나는 마커를
발하였다.

상기 마커가 CMV 저항성 유전자와 어느 정도 연관되어 있는지 알아보기 위하여,
항성 식물체와 이병성 식물체 그리고 F1, 저항성 F2 183개체 및 이병성 F2 64개체
대하여 다시 RAPD-PCR을 실시하였다. 그 결과, 도 2a 및 도 2b에서 보는 바와
이, 상기 마커가 100% 등반분리 (co-segregation) 되는 것을 확인할 수 있었다.

<실시예 4>

RAPD 마커의 클로닝과 엔기서열 결정

CMV 저항성 인자 특이 증폭 프라이머 (OPC-07 프라이머)를 이용하여 증폭된 DNA
질로부터 분리·정제하여 pGEM-T 빡터 (Promega사)에 클로닝하였다. 클로닝된 플라

미드를 전기충격방법으로 대장균 DH 10B에 도입한 후, 항생제가 들어 있는 배지에 형질전환체를 선반하였다. 선발된 형질전환체로부터 제조한 플라스미드를 분리하 . 상기 플라스미드 내에 삽입된 DNA의 염기서열을 분석하였다. 결정된 염기서열을 4열번호 2로 기재하였다.

<실시예 5>

CAPS 마커로의 전환 및 인버스 PCR을 수행하기 위한 서던 블롯 실시

저항성 식물체와 이병성 식물체의 개암 DNA를 준비하고 DNA 제한효소 *EcoRV*, *XbaI*, *KpnI* 및 *XbaI*으로 절단한 후, 아가로즈 젤에 전기영동하였다. 나일론 멤브
인에 DNA를 이동시킨 후, 실시예 4에서 증폭된 DNA를 텁침으로 하여 서던 블롯을
시하였다. 그 결과를 도 3에 도시하였다. 도 3에서 보는 바와 같이, *EcoRI*, *XbaI*,
*KpnI*에 대해서 다형성을 나타내었고, *HindIII*에 대해서는 다형성이 나타나지 않았다.
기 결과를 바탕으로 *EcoRI*, *XbaI*, *EcoRV* 제한효소를 인버스 PCR과 CAPS 마커 전환
사용하였다.

<실시예 6>

CMV 저항성 유전자와의 근접 DNA 염기서열 결합

실시예 5의 결과(도 3)를 바탕으로 실시예 4에서 분석된 RAPD 마커의 염기서열
일부를 사용하여 프라이머를 제작하였다. 제작된 프라이머의 염기서열을 하기 표
에 기재하였다.

표 1]

포장이어명	포장이어 사용된 프라이머	염기서열(S'-3')	서열번호
CRS0007a	GTC CGG AGG ATA GGC CAA AAG	TAT GCG CTA TGA GTC CGT AC	3
CRINVR65	TTC GGC CGC TAC GAG TGG TCA CC	ACT GAC TAC GAG TGG TCA CC	4
CRINVR125	TAG GGG TTC AAG GAT CAC CC	TAT CCT CTT ATG CAA TGG GC	5
CRINVR629	TAT CCT CTT ATG CAA TGG GC	AAT CCT TGT ACC TCA CAA CG	6
CRINVR795	AAT CCT TGT ACC TCA CAA CG	CGA TGG CAC TTC ATA ATG CC	7
CRINVR840	CGA TGG CAC TTC ATA ATG CC	GAC TTG GGC ACT ACA CTG GA	8
CRINVR975	GAC TTG GGC ACT ACA CTG GA	ACA TAG GCG TGT GCT CTG GA	9
Inv 1030514 R	ACA TAG GCG TGT GCT CTG GA	GGA GTT TCA TCA TAT GAA GCC	10
Inv 1030514 F	GGA GTT TCA TCA TAT GAA GCC	GGT TCA AGG ATC ACC CAA ATA A	11
CR 1541-3	GGT TCA AGG ATC ACC CAA ATA A	TTC ACC TTA GTC CCC AAA CCT A	12
InvXbTopF1010	TTC ACC TTA GTC CCC AAA CCT A	AAC CCA AGC CTA TTT TAG CC	13
InvXbTopR107	AAC CCA AGC CTA TTT TAG CC	GGT AAT AGG GTT CAC CTT AGT C	14
EV Inver F2	GGT AAT AGG GTT CAC CTT AGT C	CCT TGA GGC AAA GAA TGG AA	15
EV-INV-XbaI	CCT TGA GGC AAA GAA TGG AA	TTT GGT AAT GAC CGG AGA CC	16
CRINVF5095	TTT GGT AAT GAC CGG AGA CC	ATA GCA GAG GAG CAC CCT AC	17
INVER0627R	ATA GCA GAG GAG CAC CCT AC	GGT ACA AGG ATT CCC CAA AGT G	18
INVER0627F1	GGT ACA AGG ATT CCC CAA AGT G	GAT TTA GTC AGT ATG ACG ATG CCA C	19
INVER0627F2	GAT TTA GTC AGT ATG ACG ATG CCA C		20
			21

상기 표 1에 기재된 프라이머를 이용하여 저항성 식물체에서 인버스 PCR을 수행
었다. 증폭된 DNA의 염기서열을 프라이머 워킹 (primer walking) 방법을 수행하여
석하였다. 그 결과, 서열번호 22로 기재되는 약 5.6kb의 DNA 염기서열이 결정되었

<신시예 7>

CAPS 마커로의 전환

상기 서열번호 22의 염기서열에서 공지된 DNA 염기서열의 DNA 제한효소 사이트 알아낸 후, 저항성 식물체 및 이병성 식물체의 개암 DNA의 제한효소 사이트를 비하여, 두 개암 DNA 간에 다양성을 나타내는 제한효소인 *Xba*I (T'CTAG_A), *Eco* (G'AATT_C) 및 *Eco*RV (GAT'ATC)를 CAPS에 사용할 제한효소로 선택하고, 적절한 길이 제한 패턴을 나타내는 DNA 단편을 증폭할 수 있도록 위치시킨 프라이머를 제작한다. 즉, 서열번호 22의 염기서열 중에서 선택되는 일련의 염기서열로 구성된 프라이머를 4개 제작하였다(하기 표 2 참조).

표 2]

1. 저항성 확인을 위한 CAPS 마커 개발을 위한 프라이머	개발을 위한 프라이머	방향	서열번호
GTAGTAGGGTACGGACTCATA	SCC07S3	경방향	23
GTCGGGACGATAGGCCAAAG	SCC07a	역방향	24
GGAGTTTCATCATATGAAGCC	CH1541-3	역방향	25
AGTGGAGCTTGGGTAGTCC	FPS5416R	역방향	26

서열번호 23과 24, 서열번호 23과 25 및 서열번호 23과 26 조합의 프라이머를 용하고, 저항성 식물체 및 이병성 식물체, 그리고 이들의 F2 집단으로부터 추출된 A를 주형으로 사용하여 PCR 증폭하였다. PCR은 94°C에서 1분 동안 주형 DNA를 증폭시킨 후, 94°C에서 1분; 58°C에서 1분; 및 72°C에서 2분을 한 사이클로 하여 총 5회 반복수행한 다음 72°C에서 10분 동안 반응시켜 종결하였다. 이후, 증폭된 A를 실시에 6에서 선정된 제한효소(*Eco*RI, *Xba*I, *Eco*RV)로 절단하고, 아가로즈 젠 전기 영동하여 호모(RR)와 헤테로(Rr)형이 구분되는지 확인하였다.

서열번호 23과 24의 프라이머 조합으로, PCR을 수행한 결과를 도 4에 도시하였다. PCR 증폭된 DNA 단편의 크기는 1.0kb이었다. 증폭된 DNA 단편을 *Xba*I으로 절한 결과, 이병성과 저항성 친의 밴드 패턴이 다른 것을 확인할 수 있었다. 또한 밴드 패턴이 실시예 1에서 F3 병 저항성을 테스트하여 예측한 F2 식물체의 유전형 동반분리되는 것을 확인할 수 있었다.

서열번호 23과 25의 프라이머 조합으로 PCR을 수행한 결과를 도 5에 도시하였다. PCR 증폭된 DNA 단편의 크기는 1.477kb이었다. 증폭된 DNA 단편을 *Eco*RI (A)와 *Sal* (B)으로 각각 절단한 결과, 이병성과 저항성 친의 밴드 패턴이 다른 것을 볼 수 있다. 또한 이 밴드 패턴이 실시예 1에서의 병 저항성 결과와 동반분리되는 것을 확인할 수 있었다.

서열번호 23과 26의 프라이머 조합으로 PCR을 수행한 결과를 도 6에 도시하였다. PCR 증폭된 DNA 단편의 크기는 1.846kb이었다. 증폭된 DNA 단편을 *Eco*RI으로 단한 결과, 이병성과 저항성 친의 밴드 패턴이 다른 것을 볼 수 있었으며, 이 밴드 턴 또한 실시예 1에서의 병 저항성 결과와 동반분리되는 것을 볼 수 있었다.

상기 결과들은, 서열번호 22로 기재되는 염기서열 중 임의의 일련의 염기서열을 라이머로 제작하여 PCR을 수행하고, 그 결과로 얻은 PCR 산물을 서열번호 22 내에 재하는 제한효소로 절단하는 경우, CMV 저항성 유전자의 존재유무 및 그 상태, 즉 모 또는 해테로인자 구분할 수 있음을 보여주는 것이다. 즉, 서열번호 22로 기재는 염기서열이 CMV 저항성 유전자와 상당히 근접되어 있으므로, 상기 염기서열들이 나타내는 어떠한 다형성을 사용하더라도 그 유전자의 존재여부를 파악하는 데 사용 수 있다.

<실시예 8>

CAPS 마커로의 전환 가능한 임의의 최소 염기서열의 수 결정

실시예 6에서 결정된 서열번호 22의 염기서열의 이용하여 CAPS 마커로의 전환 가능한 가장 적은 일련의 염기서열의 수를 결정하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다.

이를 위해 서열번호 23(Forward [SCC07S3]: 5'-GTAGTAGGGTACGGACTCATA)의 염기열을 서열번호 27(Forward [SCC07S3-change]: 5'-gGTAGTAGGGTACGg)의 염기서열로, 그리고 서열번호 25(Reverse [CR1541-3]: 5'-GGAGTTTCATCATATGAAGCC)의 염기서열을 서열번호 28(Reverse [CR1541-3]: 5'-gGGAGTTTCATCAgC)의 염기서열로 각각 변형하였 (소문자는 임의 추가). 상기 변형된 서열번호 27 및 서열번호 28의 프라이머를 통하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94°C에서 1분 동안 주형 DNA를 변성시킨 후, 94°C에서 1분: 50, 52, 54, 56 또는 58°C에서 1분: 및 72°C에서 2분을 한 사이클로 넝여 총 40회 반복수행한 다음 72°C에서 10분 동안 반응시켜 종결하였다. 증폭된 A 단편의 크기는 1.477kb이었다.

이후, 증폭된 DNA를 EcoRI로 절단하여 아가로즈 겔에 전기영동한 결과, 도 7에 표시된 바와 같이, 이병성과 저항성 친의 랜드 패턴이 다른 것을 볼 수 있었으며, 랜드 패턴 또한 실시예 1에서의 병 저항성 결과와 동반분리되는 것을 확인할 수 있다.

따라서, 상기 결과는 염기서열이 나타내는 다형성은 서열번호 22의 염기서열 중
서 선택되는 일련의 염기서열을 포함하는 프라이머를 작성하여 상기 프라이머로
R을 수행한 후, PCR 산물을 적당한 DNA 제한효소로 절단하여 나타나는 밴드 패턴의
내로 CMV 저항성 유전자의 존재여부를 식별하는 것이 가능한 것을 입증한 것이다.

발명의 효과】

상기한 바와 같이, 본 발명은 오이 모자이크 바이러스 저항성 유전자와의 연관
도가 매우 높은 유전자 염기서열을 제공함으로써 감별의 오류가 거의 없이 효율적
로 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체를 감별할 수 있도록 한다. 또한, 식물
내에서 상기 염기 서열의 존재 유무를 감별할 수 있는 본 발명의 문자 표지를 이
하면, 오이 모자이크 바이러스를 직접 식물체에 접종하지 아니하고도 신속하고 안
정으로 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체를 선발할 수 있다.

【허청구범위】

【항 1】

조직배양에 의해 무성번식되고, 서열번호 22로 기재되는 염기서열을 함유하는
이 모자이크 바이러스 저항성 식물체.

【항 2】

제1항의 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체로부터 수득되고, 서열번호 22로
제되는 염기서열을 갖는 종자.

【항 3】

서열번호 22로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드

【항 4】

서열번호 22로 기재되는 염기서열 중에서 선택되는 일련의 염기서열을 포함하는
이 모자이크 바이러스 저항성 식물체 검출용 프라이머.

영구항 5]

제4항에 있어서, 서열번호 23 내지 28 중에서 선택되는 염기서열을 포함하는 프리머.

영구항 6]

제4항의 프라이머를 이용하여 CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence) 석을 수행하는 것을 포함하는 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체를 검출하는 법.

영구항 7]

제6항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 23 내지 28로 이루어진 군에서 선택되는 염기서열을 포함하는 프라이머인 것을 특징으로 하는 방법.

영구항 8]

제4항의 프라이머를 이용하여 CAPS 분석을 수행하는 것을 포함하는 오이 모자이크 바이러스 저항성 식물체의 유전자형 (genotype)을 감별하는 방법.

▶구항 9]

제8항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 23 내지 28로 이루어진 군에서 선
되는 염기서열을 포함하는 프라이머인 것을 특정으로 하는 방법.

▶구항 10]

서열번호 1로 기재되는 프라이머를 이용하여 RAPD(random amplified
lymphotic DNA) 분석을 수행하는 것을 포함하는 오이 모자이크 바이러스 저항성 식
체를 검출하는 방법.

▶구항 11]

서열번호 2로 기재되는 염기서열을 포함하는 오이 모자이크 바이러스 저항성 식
체 검출용 표지인자들 탐침으로 이용하여 RFLP(restriction fragment length
lymorphism) 분석을 수행하는 것을 포함하는 오이 모자이크 바이러스 저항성 식을
를 검출하는 방법.

▶구항 12]

제6항 내지 제11항 중 어느 한 항의 방법에 있어서, 상기 식물체는 오이, 수박,
주, 메론, 배추, 달배, 페루니아, 목화 및 장미로 이루어진 군에서 선택되는 것을
정으로 하는 방법.

영구항 13]

서열번호 2로 기재되는 염기서열을 포함하는 오이 모자이크 바이러스 저항성 식
체 검출용 표지인자.

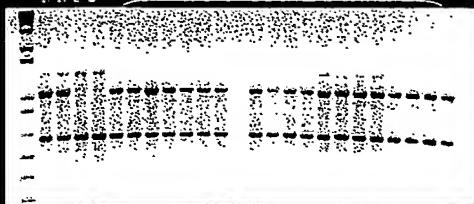
{ 5 - 31 }

EDITION : CPT-01 CPT-10 DEC-01 CPT-01 CPC-01 FPT-01
PSS PSS PSS PSS PSS PSS PSS PSS

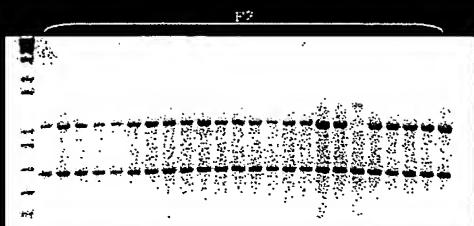
RRSSRHSRSSRHS

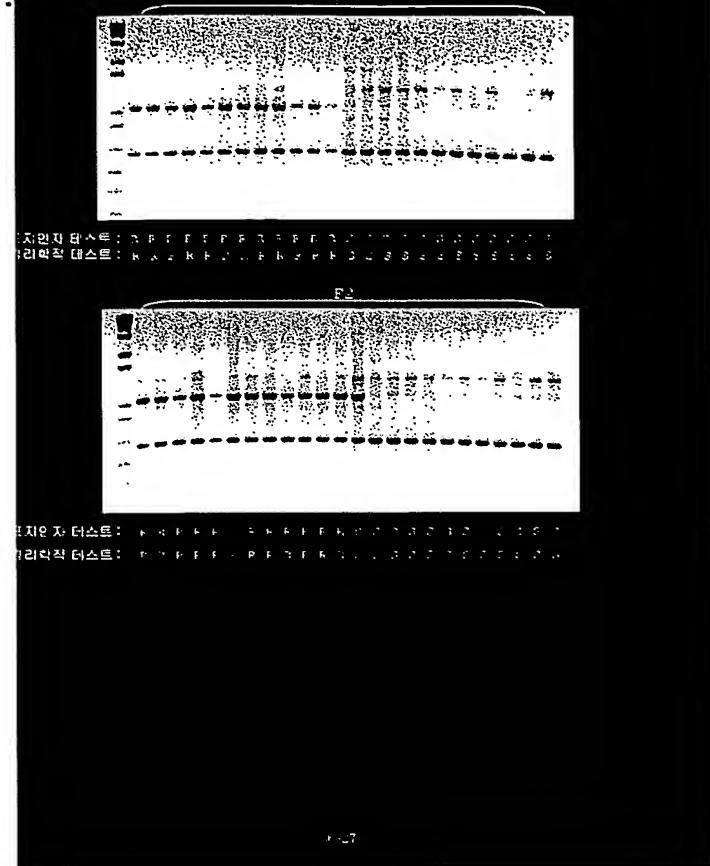
- 2a]

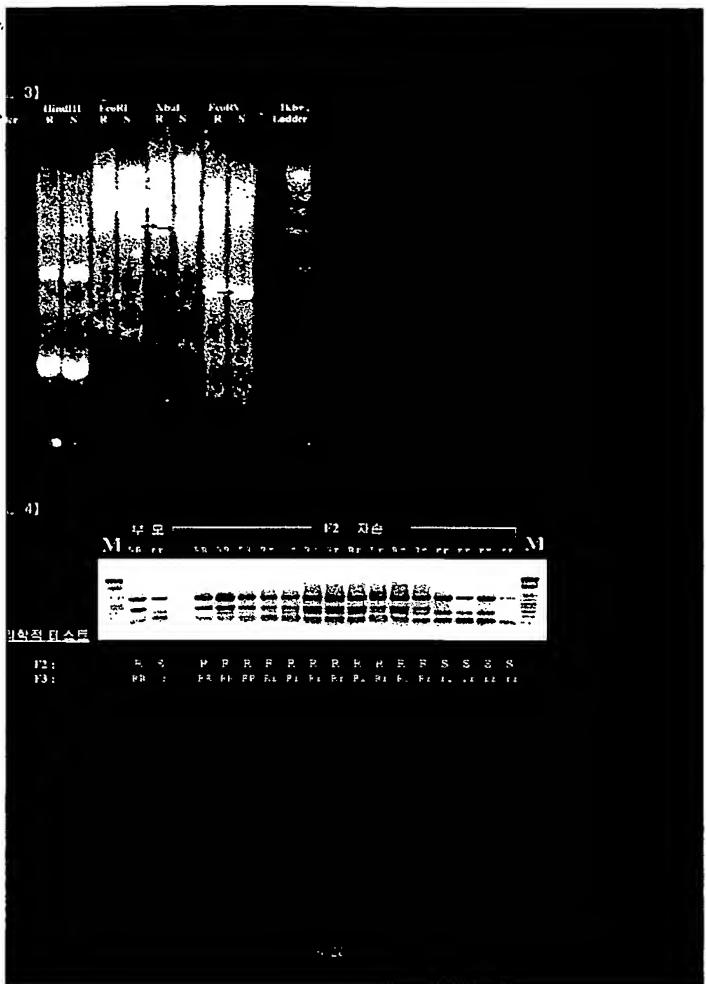
• Plant sample: 333

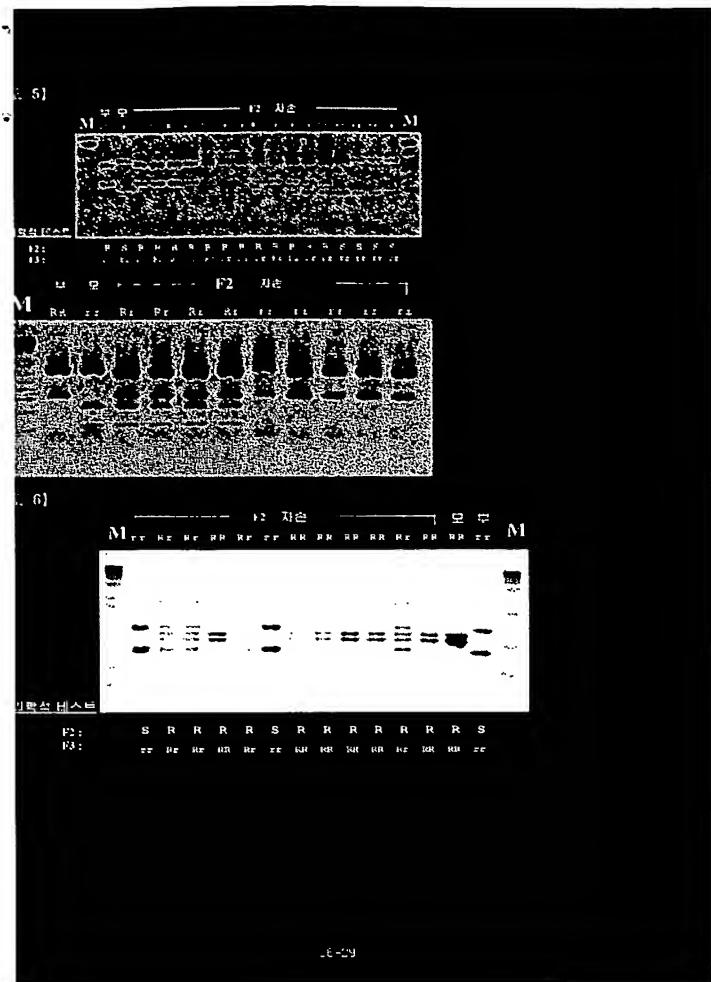


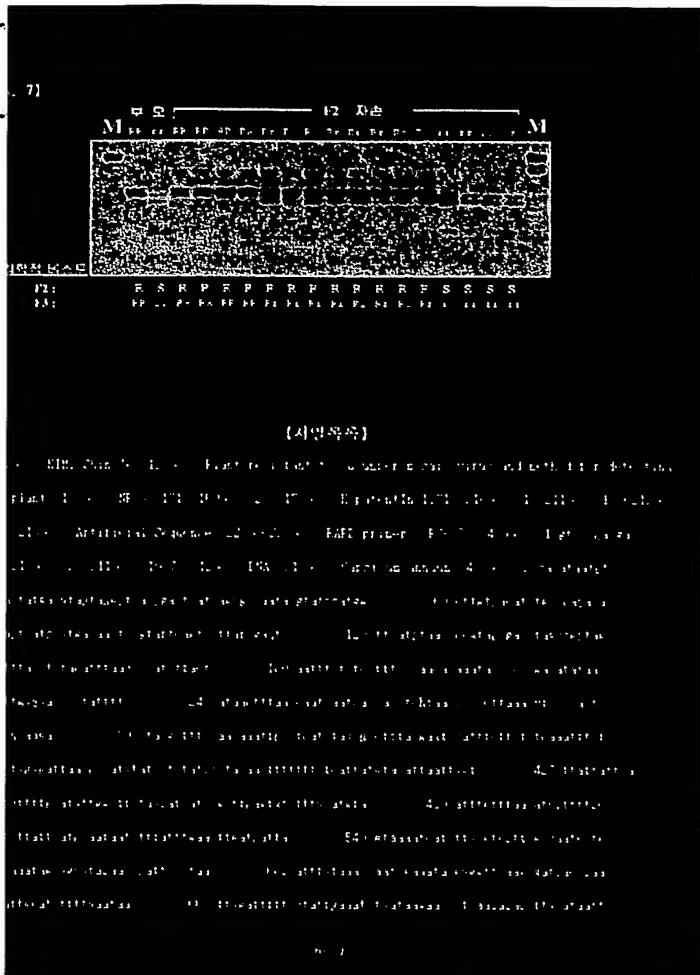
[제작자] 테스트 : [제작일] 2024-01-01 [제작장소] 테스트장소
[관리자] 허스트 : [관리일] 2024-01-01 [관리장소] 허스트장소











<210> 13 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 <210> 13 ggttcaaggg tcccccaaat aa
 <210> 14 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> InvXBTopR107
 ser for inverse PCR <400> 14 ttccacccatg tcccccaacc ta
 <210> 15 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> EV Inver F2
 ser for inverse PCR <400> 15 eacccttgc ttttttagcc
 <210> 16 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> EV-INV-XbaI
 ser for inverse PCR <400> 16 ggttaataggg ttccaccttag tc
 <210> 17 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CRINVF5095
 ser for inverse PCR <400> 17 ctttgtggcc aagaatggaa
 <210> 18 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CRINVR4776
 ser for inverse PCR <400> 18 ttgttgtatg accggagacc
 <210> 19 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> INVERO827R
 ser for inverse PCR <400> 19 atccacgggg agcccccac
 <210> 20 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> INVERO827F1
 ser for inverse PCR <400> 20 ggtacaaggg tttcccaaat tg
 <210> 21 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> INVERO827F2
 ser for inverse PCR <400> 21 gattttgtca gtatgcgtat gccac
 <210> 22 <211> 5591 <212> DNA <213> Capsicum annuum <400> 22 tctagaacta
 tgatcat gggcgtcaat cctctgacct ttactagctc taagggtttag 60 gaggatcctc aaagggttat
 tgagata gaaaaatcat tttaggtgtat acatgtttc 120 gactctgtgg ggtataat ttccaaaaat
 ctggagg atgtgttata tcaatgttat 180 gggggatgtat gctgtgttag
 tatggca tattttctt 240 gtatcccttc tgatattttc ttccctcagg agataaggaa acggaaatgt
 tagttta 300 tgaataactt gataagggtt tgatccccc tagtattttc ctgttaggtg ccctctgtct
 attttttt tagaaatggg gttcccttta gatgtgtata gattatcgct agttgtataa 420 ggtactatg

>aaatgt accctctccc taaaatggat gattttatca tccagctca 480 gggtgcaaaag tacttttcta
 >ttaact ctgttaaagg tattattatg tgaaaatag 540 ggttgtggat atccctaagg ctacttttca
 >cagatg ggtccatag agttttgg 600 gatgtccatg gatgtacta atgcctccgggt ggcaatcaag
 >tatgtg acatagtatt 660 ctgttagtc ctggatattt gtgttattgt gttaatagat gatattttgg
 >atctaa 720 gacgcgggtt gatcacggcc alcatctcca tatagttta caaatttta aagatcaact
 >gttgtaccc aaattttcta agtgtaatg atgttgtatg gttgtggatctt 840 tatttttct
 >ggggta ttatggggg tccacaaaaa tttttgcgg tgaagaangtg 900 gctttaaaacc aigatccaa
 >atattta gagtttttgg gtttgtatg atattttagg 960 aggttttgtgg aggttttttc acaatgtat
 >atattta ttaatgttaac tcagaaaaaa 1020 ggtatgtttt ctatgttcca atgttgttca ggttagcttt
 >aaatgtt aaggataatgtt 1080 gactttggat aigatcttga ccciacccgg aggttttaat gttttttaa
 >tgtgtca 1140 tccccgttag gactttggtg tttttgtatg tagaaacat agggttctgg cctatgttca
 >) tagaaatgtt aagatcaatg aataatgtatg aactttagat tatttgtt 1260 gttatitica
 >aaatgtt ggtatcggtt tttgtatggg ttcgttggat tataatgttt 1320 gatcataaga ttcgtttagta
 >tccacc cagaaggagg tgaatctcag gcaaaaggaca 1380 tggctttagt ttcgttcaaaagg ctatgttca
 >tccatt acaacccagg taaatctaac 1440 atggtttgtt gttatcttca taggttgcctt aigggaaatgt
 >aaatat ggttggaa 1500 aaatgtatgtt tggtggatgtt ttttcccgaa tttggtaacc tttggatgtcg
 >tttggat 1580 tctggggatg ggggtttatgtt tttttcaagg gtttttttttgcgttcaatgtt tttttttttt
 >) aaaggccaaac atgtttttgg tccatcttca atgtcaatca aatgtatgtt gggtaacacag 1660 aatgtttatgg
 >tcaatgtt tggtagtatgtt ggttcaaaagg tagatgtatgtt 1740 gttaccgtat ttaatgggtt
 >aaatgtt atttttttttt aatgttcaatgtt ttttttttttgcgttcaatgtt 1860 aatgttcaatgtt
 >ttttgcgttcaatgtt 1920 gttggggaaacc taaggccctgg tggatcttca ctgtcggttttggatgttca
 >aaatgtt 1980 tggatgtttt tttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgttccatgtt
 >) ttatgtatgtt gttttttttt ttttttttttgcgttcaatgtt 2100 actacgttca
 >tttccatt caggatataca tcaatgttca tggtgcttta gtttttttta 2160 tatctgtatgttcaatgttca

ser for CAPS <400> 23 **gtatgtatggat acggacat** a
<210> 24 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> SC007a
ser for CAPS <400> 24 **gtccccgacga tagcccaaaa g**
<210> 25 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CR1541-3
ser for CAPS <400> 25 **ggagtttcat ctagtggatgc c**
<210> 26 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> FP5416R
ser for CAPS <400> 26 **atgtggatctt ggatgtatcc**
<210> 27 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
7TS3-change primer for CAPS <400> 27 **ggatgtatgg tacgg**
<210> 28 <211> 15 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> CR1541-3
ser for CAPS <400> 28 **ggggatttca tcage**

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR04/002732

International filing date: 27 October 2004 (27.10.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR

Number: 10-2003-0075272

Filing date: 27 October 2003 (27.10.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 12 November 2004 (12.11.2004)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.